

牟婁病剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析

岩田 淳 1)東京大学大学院医学系研究科 分子脳病態科学
間野 達雄 2)東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

牟婁病の分子病態を明らかにするためには脳内、それも神経細胞内でどのような遺伝子発現変化が生じているかを検討する必要がある。このためには神経細胞特異的な遺伝子発現変化を捉える技術が必要となるが、我々は神経細胞核を特異的に分離する事で特異的なエピゲノム変化を捉える方法を採用し、特にゲノムメチル化に注目して検討を行った。これにより 471 と非常に多数の遺伝子のメチル化が正常対照と比べて変化していることを明らかにした。また、ALS、PDC の病型間で比較したところ、3つの遺伝子のメチル化が有意に変化している事を明らかにした。

A.研究目的

牟婁病はその地域集積性から家族性もしくは風土病であることが想定されながら現在まで明らかな原因は特定されていない。また、近年臨床病型はALSに比してPDCが多くなっており、何らかの環境要因の関与も考えられる。本研究では、病因、環境因双方を反映する因子として、1. エピゲノムのうちゲノム CpG メチル化の変化を測定する事で牟婁病特異的な変化を同定すること、及び 2.臨床病型の違いがDNA のメチル化変化によって切り分けることができるかを明らかにすることにより、これら病態の分子基盤を解明することを目的とする。

B.研究方法

年齢を適合させた牟婁病患者 10 名、健常者コントロール群 10 名の剖検脳を用いた。側頭葉から抗 NeuN 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、神経細胞核のみを選択的に抽出、そこから DNA 抽出を行った。抽出した DNA

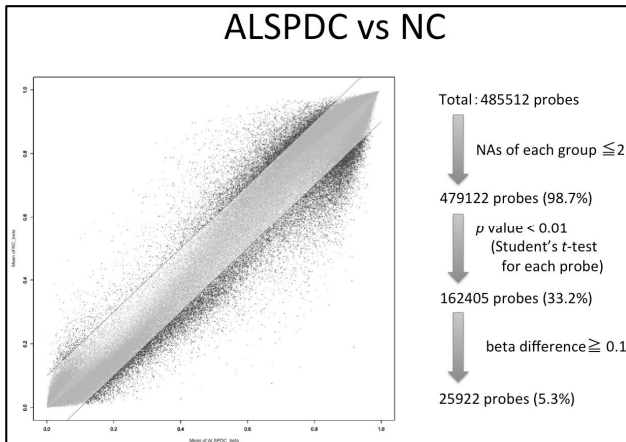
は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

(倫理面への配慮)

検体はすべて文書による同意取得済みであり、匿名化されている。当該課題は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて審査の上承認されている(2186-(7))。

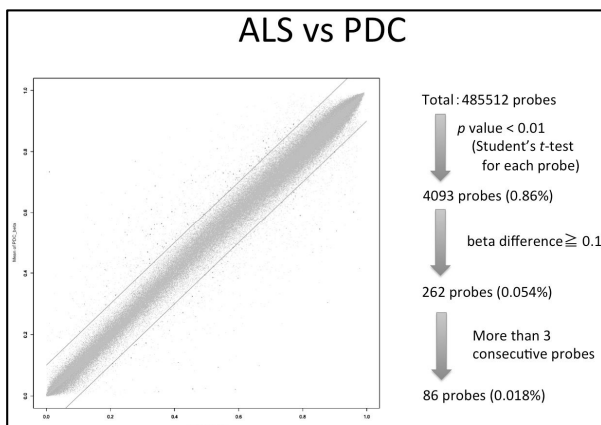
C.研究結果

牟婁病患者10名の平均年齢は70.9歳であった。臨床病型としては、ALS型5名、PDC型5名であり各平均年齢は68.6歳(63-73歳)、73.2歳(70-79歳)であった。健常者コントロール群について平均年齢は71.5歳であった。Student t検定p値<0.01、 β 値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし、25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこ



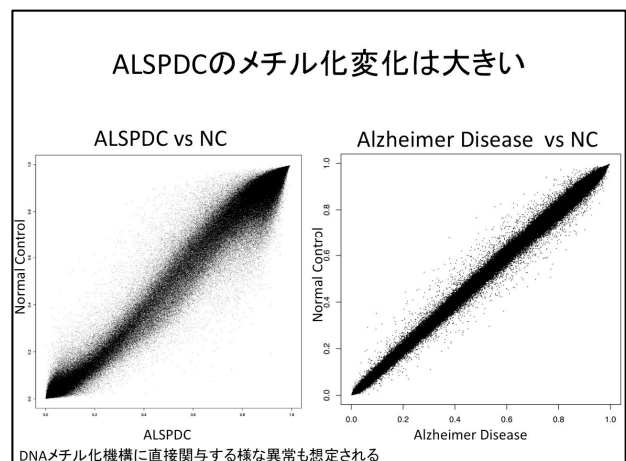
と考慮するとともに、メチル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して、抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し、1380プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうち、遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており、特に発現調整に最も重要と考えられるTSS200またはTSS1500に含まれたプローブは254カ所、これらは123遺伝子に関連しているものであった。これらの遺伝子群の機能的内訳としては、シナプス伝達、細胞骨格、転写抑制などに関与する物が多く見られ、牟婁病の特異的病態を表しているものと考えられた。

一方で、臨床病型によって分け、同様の基準(p



値<0.01, ALS/PDC群間差0.10, 連続3プローブ以上)でプローブを選定したところ,29プローブが選定され, ZIC1, ZIC4, LOC145845の3遺伝子が残った。ZIC1,4は双方とも3q24に存在し, Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。

正常コントロールとの比較で抽出された遺伝子の数はアルツハイマー病/正常で抽出された遺伝子(下図)の数よりも遙かに多く,その原因としては1.牟婁病に特異的な現象,もしくは2.サンプル数が少ないためのアーチファクト,が考えられた。しかしながら牟婁病内での比較では抽出された遺伝子の数は3つであり,サンプル数の少ない事が原因とは考えにくいと結論した。



D.考察

ALSPDC と健常者の比較, ALS と PDC の比較により抽出されてきたプローブには全く重複を認めず, 疾患の発症に関する病態の分子基盤とは別に, 臨床病型に関する分子基盤が存在している可能性が示唆された。

E.結論

今回の結果は疾患発症, および臨床病型の病

態機序解明に重要な端緒となる可能性がある。
今後さらに発展させ、特異的な遺伝子調節系の
解析を行いたい。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし